

Title	Biochemical Studies on Antisense Oligonucleotides Containing Various Bridged Nucleic Acids, BNAs
Author(s)	ソムジン, ルンジェアン
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49178
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ソムジン ルンジェアン Somjing Roongjang
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21964 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	Biochemical Studies on Antisense Oligonucleotides Containing Various Bridged Nucleic Acids, BNAs (架橋構造型人工核酸 BNA 類を導入したアンチセンスオリゴヌクレオチドの生物化学的研究)
論文審査委員	(主査) 教授 今西 武 (副査) 教授 宇野 公之 教授 小林 資正 教授 土井 健史

論文内容の要旨

近年、ヒトゲノムの全塩基配列が解読され、疾病の原因となっている遺伝子の同定が進み、遺伝子治療薬の開発が盛んに行われている。遺伝子治療法として期待されている方法には、遺伝子発現を転写レベルで抑制するデコイ法やアンチジーン法、翻訳レベルで抑制する RNA 干渉法やアンチセンス法、リボザイム法、DNA エンザイム法などが知られている。これらの中で著者はアンチセンス法を用いて研究を進めてきた。

アンチセンス法の作用機構は、アンチセンスオリゴヌクレオチドが mRNA と結合することにより、リボソームと mRNA との結合を阻害しタンパク質生成を阻害する機構です。また、さらに活性を高めるために RNase H が DNA-RNA 二重鎖を認識して RNA のみを特異的に切断することを利用されている。1998 年、初のアンチセンス治療薬としてホスホロチオエート型オリゴ (PS-オリゴ) を有した Vitravene が CMV (cytomegalovirus retinitis) 治療薬として認可された。PS-オリゴは RNase H による認識、高い酵素耐性能を有しているが、作用濃度によっては毒性を生ずるという問題点を抱えています。そこで、RNA に対する高い結合親和性や配列特異性、低毒性、高い酵素耐性を有する人工核酸の合成研究がなされている。

当研究室では架橋により糖部のゆらぎを束縛した核酸類縁体 BNA (Bridged Nucleic Acid) 類の開発を進めてきた。その中で第一世代の 2',4'-BNA (LNA) の合成に成功している。2',4'-BNA を含むオリゴヌクレオチドは高い配列認識能があり、相補鎖 RNA に対して高い結合親和性を有することに明らかにしている。さらに、ヌクレアーゼに対しても、高い酵素耐性能を有していることを確認している。また、2',4'-BNA オリゴ中に天然核酸を少なくとも 4 塩基連続して設計することにより、RNase H による切断認識能を保持していることも明らかにしている。現在、BNA は様々なゲノムテクノロジーへの応用に向け、広く研究に用いられている。さらに新たな 2',4'-BNA^{COC} 及び 2',4'-BNA^{NC} の合成に成功した。そして、2',4'-BNA^{COC} と 2',4'-BNA^{NC} を組み込んだオリゴが 2',4'-BNA と同様、相補鎖 RNA との高い結合親和性、高い酵素耐性能を有することを明らかにしている。このようにアンチセンス医薬品に重要とされる性質を有する 2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{COC} 及び 2',4'-BNA^{NC} はアンチセンス分子として非常に有効なツールとなる可能性がある。BNA オリゴの応用の一環として、抗アポトーシス遺伝子の一種である *bcl-xL* を標的とした、2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{COC} 及び 2',4'-BNA^{NC} のオリゴを用いてアンチセンス効果を検証した。

bcl-xL mRNA の翻訳開始コドンを含む 18nt または 19nt を標的部位とし、2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{COC} 及び 2',4'-BNA^{NC} の BNA オリゴとともにコントロール用として天然 DNA オリゴ、PS-オリゴの各アンチセンス配列オリゴ及びスクランブル配列オリゴを設計した。

まず、合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドの相補鎖 RNA との結合親和性を評価した。BNA 類の修飾数を増やすことで T_m 値が高くなることが明らかになった。BNA 類修飾アンチセンスオリゴが天然 DNA や PS-オリゴと比較して、標的部位の相補鎖 RNA に対して極めて高い結合親和性を有していることを確認した。

続いて、ヒト肝癌細胞 HepG2 を用いて mRNA レベルにおけるアンチセンス効果を検討した。2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{COC} 及び 2',4'-BNA^{NC} を 4、6、9 ユニット導入したアンチセンスオリゴを用いた場合、導入のユニット数の増加に伴い、濃度依存的なアンチセンス効果 (*bcl-xL* mRNA 量の減少) が認められた。なお、スクランブルオリゴは *bcl-xL* mRNA 量に変化を与えなかった。一方、アンチセンス DNA オリゴ、PS-オリゴは、BNA 類オリゴのような顕著なアンチセンス効果を示さなかった。

次に、Western blot 法により Bcl-xL タンパク質レベルの発現抑制効果を評価した。BNA 類アンチセンスオリゴの場合ではほぼ完全に Bcl-xL タンパク質の発現を抑制することが示された。一方、スクランブルオリゴには Bcl-xL タンパク質発現抑制に変化が認められなかった。このことから、BNA 類オリゴは *bcl-xL* mRNA レベルと Bcl-xL タンパク質レベルで非常に強い抑制効果を示すことが明らかになった。

さらに、Bcl-xL タンパク質を抑制することでアポトーシスが誘導されているか検討した。アポトーシスの検出にはエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 の活性測定を行った。BNA 類オリゴにおいて天然 DNA や PS-オリゴより高いカスパーゼ 3 活性が認められた。さらに抗癌剤と併用することで、BNA 類オリゴでは天然 DNA や PS-オリゴと比較してカスパーゼ活性を上昇させる効果が示され、2',4'-BNA^{NC} オリゴは 2',4'-BNA オリゴと 2',4'-BNA^{COC} オリゴより高いカスパーゼ活性化能が確認された。

論文審査の結果の要旨

架橋構造型人工核酸である BNA 類は、相補鎖 RNA との大変強い結合親和性を有することが既に判明しており、アンチセンス法などによる新しい医薬品開発の基盤材料として有用視されている。

申請者は、BNA 類を含むオリゴヌクレオチドのアンチセンス法への有用性を検証することを目的として、抗アポトーシス遺伝子群の一つである *bcl-xL* を標的とした遺伝子発現抑制評価研究を展開した。用いた BNA は、2',4'-BNA、2',4'-BNA^{COC} および 2',4'-BNA^{NC} で、*bcl-xL* mRNA の標的部位は、開始コドンを含む 18nt、19nt とした。それぞれの BNA を 4、6、9 ユニット導入した修飾オリゴヌクレオチドとともに天然 DNA オリゴと S-オリゴを各アンチセンス配列オリゴおよびスクランブル配列オリゴとして使い、HepG2 培養細胞中で評価研究を行った。その結果、いずれの BNA オリゴも優れたアンチセンス効果を示すことを、mRNA レベルおよびタンパク質レベルで、明らかにした。中でも 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスオリゴが最も有効であることを実証している。

以上の研究成果は、博士（薬学）の学位論文として相応しい内容であると判断致します。